

DEGRADATION BACTERIENNE DU PETROLE BRUT DANS DES
SEDIMENTS MARINS LITTORAUX DE LA BRETAGNE NORD

P. FUSEY, J. OUDOT

Laboratoire de Cryptogamie, L.A. CNRS 257
Muséum National d'Histoire Naturelle
12 rue de Buffon - 75005 PARIS

SUMMARY

BACTERIAL DEGRADATION OF CRUDE OIL IN
NORTHERN BRITTANY SEASHORE SEDIMENTS

The weathering of petroleum was monitored by high temperature high resolution gas-liquid chromatography in northern Brittany seashore sediments, either contaminated by the Amoco Cadiz oil or experimentally polluted. Most aliphatic and aromatic hydrocarbons were relatively rapidly degraded, but some compounds like isoprenoids (pristane and phytane), triterpanes and alkylated phenanthrenes and dibenzothiophenes appeared to be more recalcitrant. In high energy sites (Roscoff beach), cleaning of the sediments was achieved between 12 and 18 months, whereas the Abers muddy sediments contained after two years bacterially neosynthesised very long chain n-alkanes (>n-C50). Interaction between physical leaching and biodegradation was responsible for sediments depuration. Aeration, nutrients availability and initial amount of oil in the sediments were the main factors affecting the biodegradation kinetics. In every site under study, a major part of the heterotrophic bacterial population was able to degrade hydrocarbons, as a result of a natural adaptation process of the indigenous microflora.

INTRODUCTION

On étudie l'évolution, sous l'action des bactéries, des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques de pétroles bruts dans des sédiments marins littoraux sableux et vaseux de la côte nord de la Bretagne.

Une première étude a porté sur le suivi des hydrocarbures de la cargaison de brut de l'Amoco Cadiz, échoué à Portsall le 16 Mars 1978, dans les sables de la plage de Roscoff et dans les vases de l'Aber Benoît et de l'Aber Wrach de Mai 1978 à Janvier 1980.

Une seconde étude, expérimentale, a été conduite à Dinard et avait pour but de suivre l'évolution d'un brut Arabian Light (BAL 150), de composition voisine de celui de l'Amoco Cadiz à la surface de sédiments sablo-vaseux de l'estuaire de la Rance, en présence de différents traitements.

Pour ces deux études, on a prélevé périodiquement des échantillons de sédiments superficiels, sur lesquels on a réalisé des dosages et analyses chimiques de la composition des hydrocarbures résiduels, ainsi que des dénombrements de la microflore hétérotrophe "totale" MT et de la microflore utilisant des hydrocarbures MA.

MATERIEL ET METHODES

Le protocole détaillé de dosage et d'analyse des hydrocarbures est décrit dans Oudot et al., 1981. Le principe consiste à extraire les hydrocarbures du sédiment par du chloroforme, puis à séparer l'extrait obtenu en fractions saturée et aromatique par chromatographie liquide. Les deux fractions obtenues sont pesées et analysées par chromatographie

en phase gazeuse à haute résolution HR-CPG.

Les dénombrements bactériens sont réalisés selon la méthode du nombre moyen le plus probable, en milieu liquide (2 tubes par dilution). La composition des milieux de culture est la suivante :

- microflore "totale" : trypticase soja : 30 g, sels d'eau de mer synthétique (HW) : 35 g, eau distillée : 1000 ml.
- microflore adaptée : sels marins HW : 35 g, KH_2PO_4 : 0,68 g, Na_2HPO_4 : 1,80 g, NO_3NH_4 : 1g, solution d'oligo éléments : 0,1 ml, extrait de levure : 10 mg, eau distillée : 1000 ml.

Pour l'expérience de Dinard, on a choisi un terrain d'essai à faible dynamique, situé en amont de l'usine marée-motrice. Les parcelles, délimitées au niveau haut de l'étiage, ont reçu le 3 Mars 1980 les traitements suivants :

- 1 - témoin non pollué
- 2 - pétrole seul (5 l. m^{-2})
- 3 - pétrole + 30 % de S320 (produit à base de vinasses de sucrerie et de sels d'ammonium d'acides gras).
- 4 - pétrole + 40 % de craie hydrophobe (Nautex)
- 5 - pétrole + S320 + craie
- 6 - pétrole + 1 kg.m^{-2} d'engrais agricole (KB, N/P/K : 22/11/11)

RESULTATS

EVOLUTION DES HYDROCARBURES DE L'AMOCO CADIZ

Roscoff

La figure 1A montre la composition, définie par HR-CPG, des fractions aliphatiques (H) et aromatiques (B) du BAL 150.

La figure 1B illustre l'évolution du pétrole dans les sables de Roscoff. Dans la fraction aliphatique, on observe la diminution régulière au cours du temps des n- et iso-alcanes, les fractions légères disparaissant avant les fractions lourdes. Les rapports nC17/pristane et nC18/phytane s'inversent (105 H), et ces deux composés restent seuls identifiables (104 H) en Janvier 1979 (temps en mois = t 10). En janvier 1980 (t 22), la disparition des hydrocarbures aliphatiques est totale (194 H).

Dans la fraction aromatique, on constate l'élimination rapide des mono- et diaromatiques (alkylbenzènes et méthyl-naphtalènes), absents dès t2. Par contre, des triaromatiques (di- et triméthyl-phénanthrènes) et surtout des aromatiques soufrés (di- et triméthyl-dibenzothiophènes) persistent jusqu'à t10 (105 B). A t22, ces polyaromatiques alkylés APD ne sont plus mis en évidence dans les sables de Roscoff.

Aber Benoît et Aber Wrach

Dans les sédiments vaseux à faible dynamique de ces sites, l'évolution du pétrole est différente (Fig. 2). En Mars 1979 (t12, C1H), on note dans l'Aber Benoît que la plupart des n- et isoalcanes à chaînes courtes et moyennes ont disparu, mais que des isoprénoides (*), en particulier PR et PH, subsistent, ainsi que des alcanes à chaîne longue (nC30-nC40) et des aliphatiques pentacycliques de la série du hopane, les triterpanes (Tr) (Boehm *et al.* 1981). Ces derniers composés sont encore identifiables à t19 (C1B) et on remarque à t19 (D1B) la présence de composés de poids moléculaire élevé, vraisemblablement des acides gras (ou esters) à longue chaîne (LCFA).

Dans l'Aber Wrach, à t22 (202H), le pristane et le phytane persistent, ainsi que les triterpanes. On note en outre la présence d'alcanes à très longue chaîne VLCA dont le spectre s'étend de nC40 à plus de nC50. A cette même époque, des APD sont encore détectés dans la fraction aromatique.

EVOLUTION DES HYDROCARBURES A DINARD

Le tableau 1 rapporte les valeurs au cours du temps de la teneur en hydrocarbures saturés et aromatiques des différentes parcelles expérimentales.

Parcelle	12 Mars 1980		11 Avril		18 Juin		17 Juillet		10 Septembre	
	H	B	H	B	H	B	H	B	H	B
1. Témoin	150	180	110	76	140	93	17	15	70	37
2. Pétrole seul	12400	2840	4050	2190	5530	2100	7670	3300	750	506
3. + S320	21400	6900	19700	4900	9900	3550	14000	4700	1900	1100
4. + Craie	39900	9000	24000	6150	9900	3050	1400	1100	820	550
5. + Craie + S320	35200	11600	38200	12000	21400	6600	-	-	13900	4800
6. + Engrais	7100	2650	11100	4760	2720	2020	6250	2340	1720	852
% perte moyenne (2-6)	0	0	16	10	57	48	68	57	84	77

Tableau 1. Evaluation gravimétrique de la teneur en hydrocarbures saturés (H) et aromatiques (B) des parcelles expérimentales (ppm/poids sec). L'épandage initial a eu lieu le 3 Mars 1980.

Au bout de 6 Mois, on constate une perte moyenne de 80 % des hydrocarbures. L'évolution chimique du pétrole est variable selon les parcelles (figure 3). Ainsi la parcelle 5 montre une évolution relativement faible de la fraction aliphatique (S5H) et plus sensible de la fraction aromatique (S5B). Les résultats des parcelles 2 à 4 sont similaires. Au même temps, dans la parcelle 6 la dégradation des fractions aliphatique (S6H) et aromatique (S6B) est beaucoup plus nette. Dans toutes les parcelles, le schéma de l'évolution chimique de cette contamination expérimentale est tout à fait comparable à celui relevé à Roscoff.

DENOMBREMENTS BACTERIENS

La figure 4A montre l'évolution de la microflore hétérotrophe "totale" (MT) et de la microflore adaptée aux hydrocarbures (MA) dans les sédiments de l'Aber Benoît, de Mars à Octobre 1979 (t12 à t19). On note que MT reste remarquablement constante au cours du temps (10^{7-8} cellules/g de sédiment humide), tandis que MA présente un maximum significatif ($P > 0,01$) en Juillet. Le rapport MA/MT reste compris entre 0,1 et 10, ce qui indique que les deux populations sont d'un ordre de grandeur comparable (moins d'un facteur 10 d'écart en un temps donné).

A Dinard, le pétrole seul a peu d'influence sur la microflore "totale" (figure 4B), mais il provoque en moins d'un mois une augmentation sensible ($X10$ à $X100$) de la microflore adaptée (figure 4C). Avant la contamination, le rapport MA/MT est compris entre 0,01 et 0,1. Dans la parcelle 2, traitée au pétrole seul, le rapport MA/MT devient égal ou supérieur à 1 en moins d'un mois. Dans les parcelles 3 à 6, les traitements induisent une forte stimulation de MA ($X10$ à $X100$) et plus encore de MT ($X100$ à $X1000$) l'action des traitements craie + S 320 étant plus nette que celle de l'engrais et du S 320 seul. Dans ces parcelles, le rapport MA/MT évolue entre 0,1 et 1 au bout de 2 à 3 mois. Ainsi MA et MT deviennent d'importance comparable entre 1 et 3 mois, selon les parcelles. Les populations sont d'un ordre de grandeur plus élevé que dans l'Aber (10^{9-10} cellules/g). L'observation qu'un épandage d'hydrocarbures provoque une augmentation rapide de la microflore capable de les assimiler confirme les résultats de nombreux auteurs (Ul Bartha et Atlas, 1977).

DISCUSSION

L'évolution des spectres des fractions aliphatiques et aromatiques du pétrole est caractéristique et reflète les données connues de la biodégradation bactérienne des hydrocarbures.

Dans les zones à forte dynamique (plage de Roscoff), l'épuration des sédiments sableux est d'une manière générale achevée 12 à 18 mois après la pollution. Certains iso-prénoïdes, en particulier le pristane et le phytane, sont plus lentement dégradés que les composés de poids moléculaire voisin. L'élimination de la majeure partie des hydrocarbures

aromatiques est relativement rapide, mais des polyaromatiques alkylés, surtout soufrés, persistent pendant près d'un an.

Dans les abers, le schéma d'évolution des hydrocarbures est différent et on note après deux ans la présence d'alcane à très longue chaîne. Ces composés ne sont pas détectés dans le pétrole d'origine et nous considérons qu'il s'agit de composés néoformés qui résultent de l'activité bactérienne dans les sédiments vaseux (Oudot *et al.*, 1981). Leur formation pourrait passer par le stade intermédiaire d'acides gras de poids moléculaire élevé (Fig. 3, D1B) qui proviennent eux-mêmes de la biodégradation des n-alcane du pétrole d'origine (*in* Watkinson, 1978). La production *in vitro* de n-alcane à chaînes longues jusqu'à n-C43 dans des cultures bactériennes sur hydrocarbures a déjà été signalée (Walker et Colwell, 1976). Nous avons observé dans l'Aber Wrach la formation d'alcane jusqu'à plus de n-C55 (Oudot *et al.*, 1981).

Le lessivage apparaît comme le facteur principal de l'épuration des sédiments littoraux, mais l'évolution chimique du pétrole contaminant est essentiellement due à l'activité de dégradation des bactéries du sédiment. Ainsi dans l'expérience de Dinard, le tableau 1 indique en 6 mois une perte moyenne de 80 % des hydrocarbures saturés et aromatiques, tandis que les analyses chromatographiques correspondantes (fig. 3) font apparaître des pertes par biodégradation comprises entre 20 et 30 %. Le lessivage concerne le pétrole brut, surtout dans les sites à haute énergie, et les produits de dégradation des hydrocarbures, beaucoup plus solubles que les composés d'origine (la biodégradation débute très généralement par une hydroxylation, *in* Watkinson, 1978).

Dans les vases de l'Aber Benoît comme dans les sédiments de l'estuaire de la Rance, les résultats des dénombrements font apparaître que 10 à 100 % de la population bactérienne est capable d'assimiler les hydrocarbures, à la suite d'un processus naturel d'adaptation de la microflore indigène pré-existante. Dans l'expérience de Dinard, la période d'adaptation varie entre 1 et 3 mois. Ceci rejoint de nombreuses observations, faites tant dans le sol et les eaux douces (Oudot, 1975 ; Benkirane-Bennis, 1981) que dans le milieu marin (*in* Bartha et Atlas, 1977). Ce processus d'adaptation paraît ainsi se réaliser dans tous milieux naturels contaminés.

L'épuration des sédiments est plus ou moins complète et rapide selon leurs caractéristiques structurales et dynamiques. Ainsi la différence entre les sédiments sableux et vaseux peut s'expliquer, pour une part, par un transfert d'oxygène moindre dans les vases, conduisant à un métabolisme bactérien différent. On sait également que la disponibilité des éléments nutritifs, en particulier N et P, joue un rôle déterminant. Si cette influence a été formellement démontrée *in vitro* (Bartha et Atlas, 1977 ; Fusey *et al.*, 1975 ; Benkirane Bennis, 1981), les données recueillies *in situ* sont plus rares et moins concordantes. Dans l'expérience de Dinard, l'accélération de la biodégradation par les fertilisants a été moindre que celle qui était attendue. Les traitements ont entraîné un accroissement sensible de la population bactérienne capable de métaboliser les hydrocarbures, mais on n'a pas constaté une accélération corrélative de l'évolution chimique du pétrole. Ceci peut s'expliquer pour une part par le lessivage prématuré des éléments nutritifs, mais il apparaît aussi qu'un autre facteur, la concentration des hydrocarbures dans les sédiments, a joué un rôle déterminant. Ainsi à Dinard, le stade de dégradation observé par HR-CPG en un temps donné apparaît plus lié à la teneur en hydrocarbures résiduels de l'échantillon qu'au traitement effectué. En effet, malgré un épandage initial identique, la parcelle 5 (S 320 + Craie) était pendant toute la durée de l'essai beaucoup plus contaminée que la parcelle 6 traitée à l'engrais où la dégradation est beaucoup plus nette (tableau 1). La différence relevée entre les concentrations peut être due aux traitements réalisés, car la craie hydrophobe fixe le pétrole à la surface du sédiment et limite le lessivage.

Il existe en fait une inter-relation étroite entre tous les paramètres, et une forte teneur en hydrocarbures peut rendre rapidement limitants les facteurs aération et/ou disponibilité des éléments nutritifs, ce qui a pour effet de retarder la biodégradation.

La chromatographie en phase gazeuse à haute résolution permet de suivre l'évolution détaillée d'un grand nombre de constituants individuels du pétrole. Malgré la haute efficacité de cette technique, il n'est pas possible de séparer tous les composés, comme les fractions lourdes et les nombreux produits de dégradation du pétrole. On ne dispose actuellement que de données très fragmentaires sur le devenir de ces composés.

RESUME

On étudie par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution et à haute température l'évolution de pétroles bruts dans des sédiments littoraux de la Bretagne nord, pollués par la cargaison de l'Amoco Cadiz ou expérimentalement contaminés. La plupart des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques identifiables sont relativement rapidement

dégradés, mais certains composés : isoprénoïdes, triterpanes et dérivés alkylés du phénanthrène et du dibenzothiophène sont plus résistants à la biodégradation. Dans les sites à forte dynamique (plage de Roscoff), l'épuration est complète après 12 et 18 Mois, tandis que les vases des abers contiennent après deux ans des n-alcane néoformés à très longue chaîne (>nC50), d'origine bactérienne. L'épuration des sédiments résulte de l'interaction entre le lessivage et la biodégradation. Les principaux facteurs influençant la biodégradation sont l'aération, la disponibilité des éléments nutritifs et surtout la concentration en produits pétroliers contaminants. Dans tous les site étudiés, une forte proportion de la population des bactéries hétérotrophes est capable d'assimiler les hydrocarbures, à la suite d'un processus naturel d'adaptation de la microflore indigène.

MOTS CLES

Hydrocarbures, biodégradation, sédiments marins, chromatographie en phase gazeuse.

REMERCIEMENTS

Cette note reproduit une partie du travail réalisé dans le cadre des contrats CNEXO/MNHN 78-5737, 79-2103 et 79-2136. Nous remercions Melle M.T. Clément pour sa collaboration technique efficace.

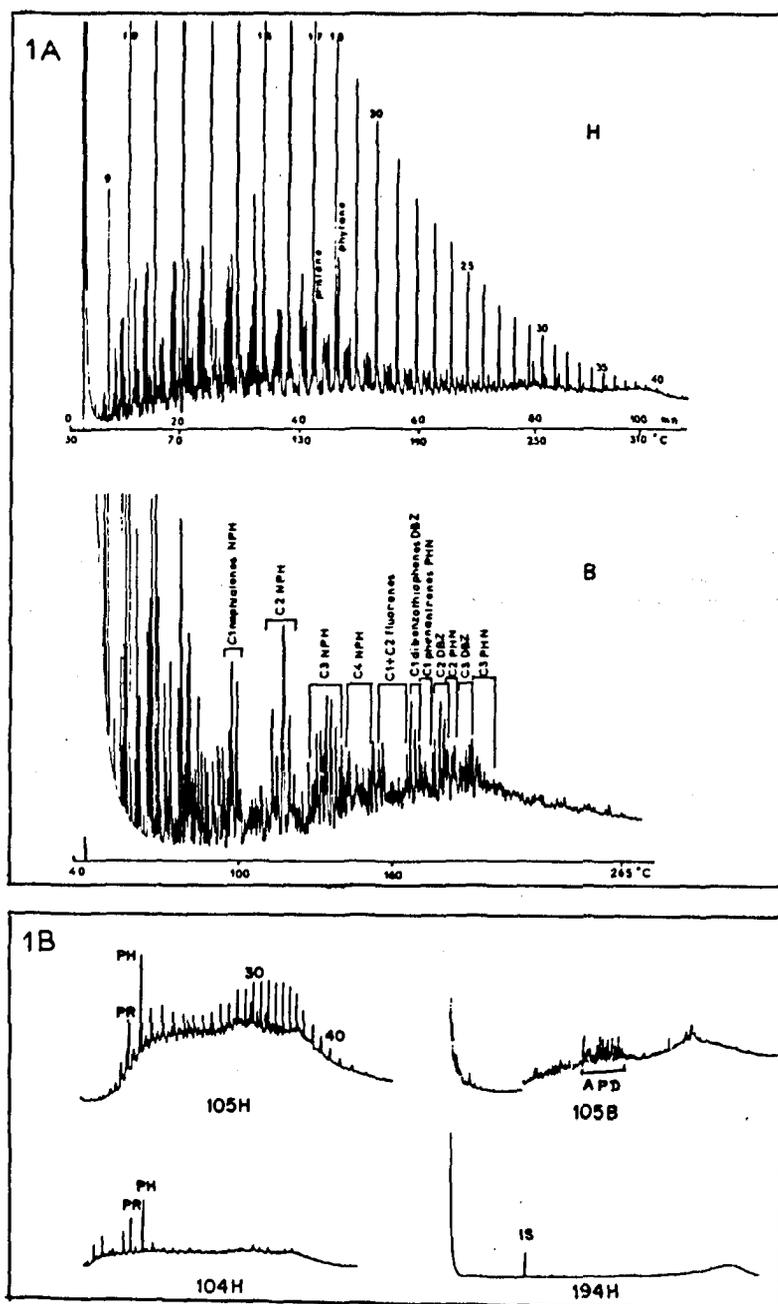


Figure 1A : Analyse par CPG à haute résolution de la fraction aliphatique (H) et aromatique (B) du BAL 150. Les numéros des pics correspondent au nombre d'atomes de carbone des n-alcanes.

Figure 1B : Evolution du pétrole de l'Amoco Cadiz dans les sédiments sableux de la plage de Roscoff. 105H et 105B, sédiment du haut de l'estran, février 1979 (t11) ; 104H, bas de l'estran, février 1979 (t11) ; 194H, bas de l'estran, janvier 1980 (t22). APD ; phénanthrènes et dibenzothiophènes alkylés. IS : Ippm étalon interne (n-eicosène -1). PR : pristane ; PH : phytane.

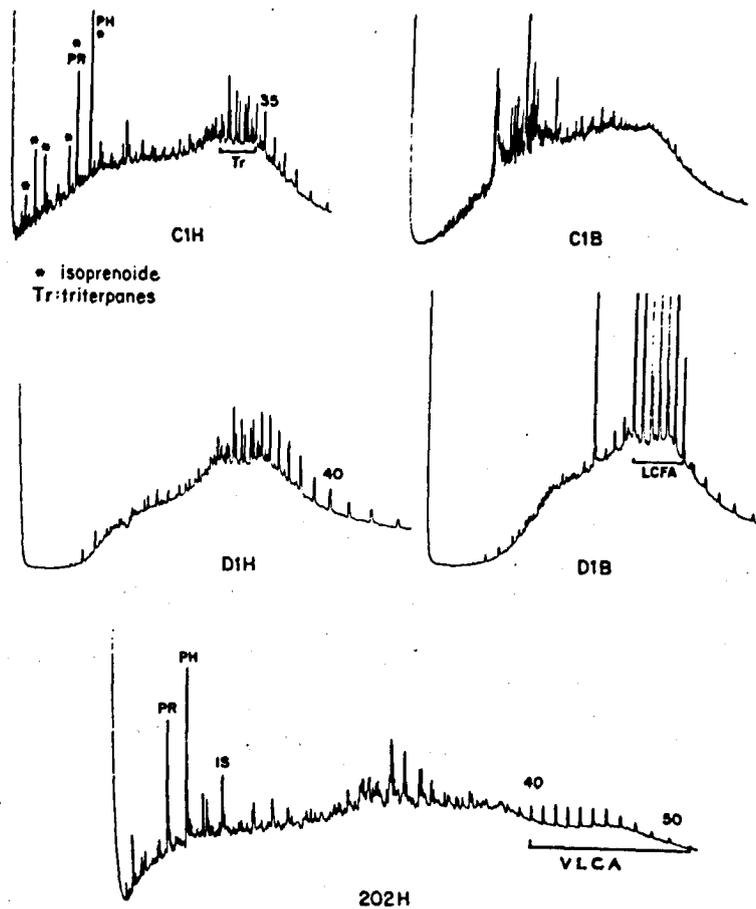


Figure 2 : Evolution du pétrole de l'Amoco Cadiz dans les vases des Abers. C1H et C1B, Aber Benoît, mars 1979 (t12) ; D1H et D1B, Aber Benoît, octobre 1979 (t18) ; 202H, Aber Wrach, janvier 1980 (t22). LCFA : acides (esters) gras à longue chaîne ; VLCA : alcanes à très longue chaîne.

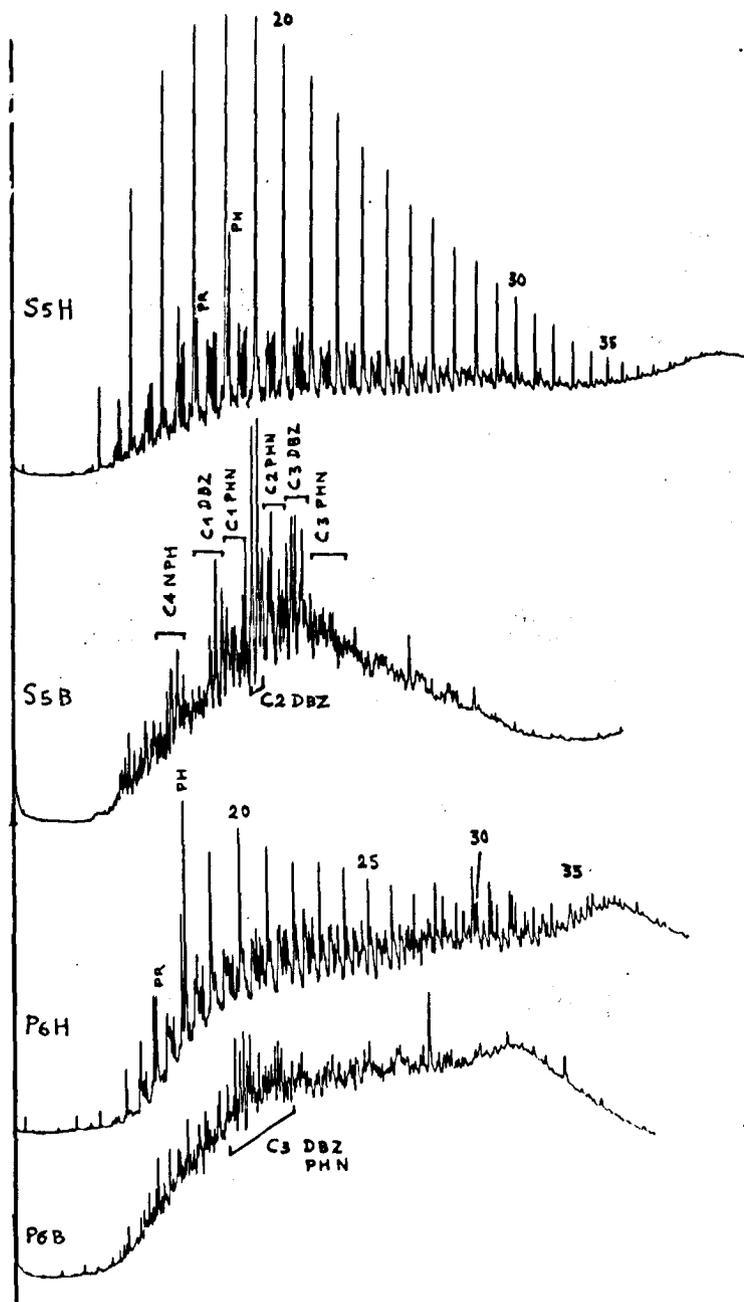


Figure 3 : Evolution du BAL 150 dans l'essai de Dinard, 6 mois après l'épandage. S5H et S5B, parcelle S320 + Craie ; P6H et P6B, parcelle engrais agricole. NPH : naphthalènes ; DBZ : dibenzothiophènes ; PHN : phénanthrènes.

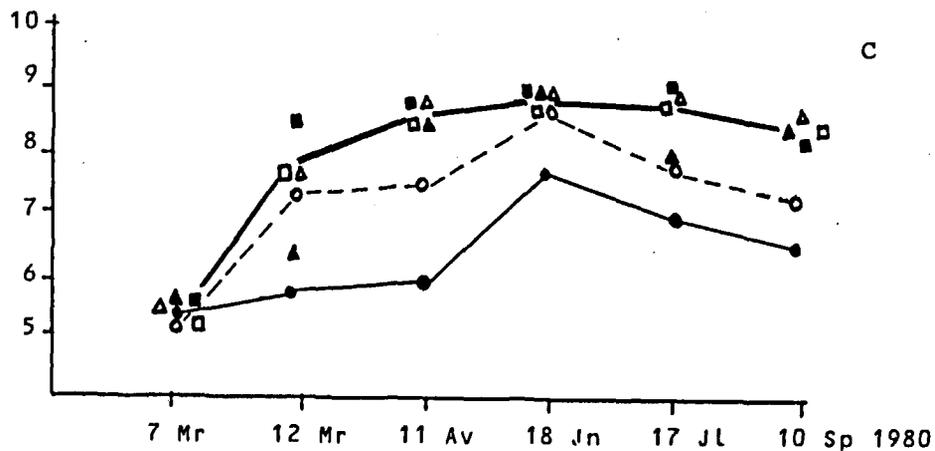
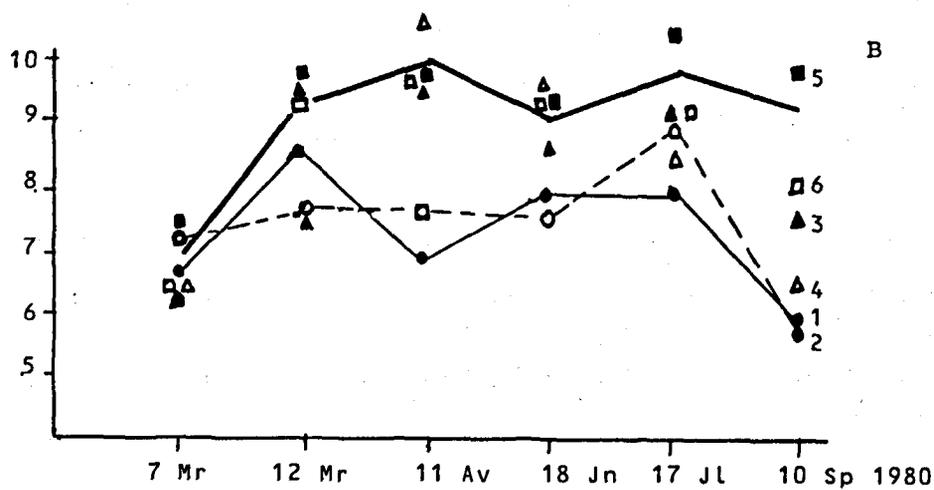
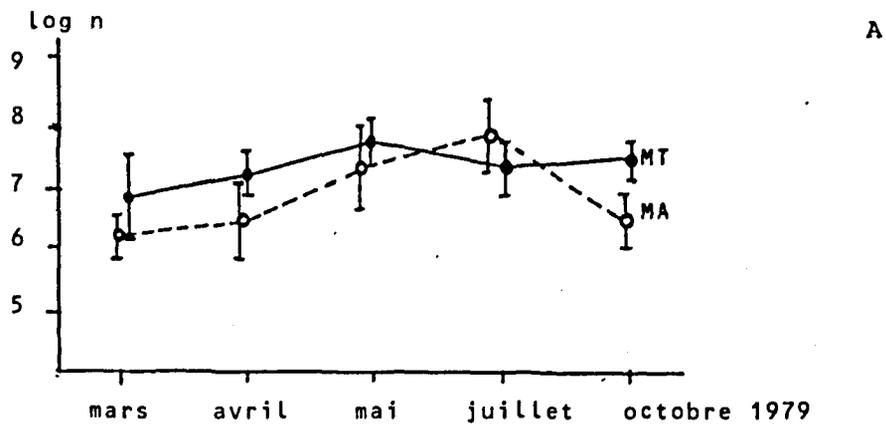


Figure 4.A: Evolution de la microflore "totale" MT et de la microflore adaptée aux hydrocarbures (MA) dans les vases de l'Aber Benoît (moyenne et écart-type de 6 dénombrements par point).

B: Evolution de la microflore "totale" dans l'expérience de Dinard sur les différentes parcelles. 1 témoin non pollué ; 2 pétrole seul ; 3 pétrole + S 320 ; 4 pétrole + craie ; 5 pétrole + craie + S320 ; 6 pétrole + craie. En trait plein, moyenne des traitements 3 à 6.

C: Evolution de la microflore adaptée dans l'expérience de Dinard.

BIBLIOGRAPHIE

- BARTHA R., ATLAS R. M., 1977. The microbiology of aquatic oil spills. Adv. appl. Microbiol., 22: 225-266
- BENKIRANE-BENNIS S., 1981. Influence de la concentration et de la source d'azote sur la dégradation *in vitro* d'un pétrole brut par des microorganismes de sols et d'eaux douces. Thèse 3ème cycle, Université PARIS 7.
- BOEHM P.D., FIEST D.L., ELSKUS A., 1981. Comparative weathering patterns of hydrocarbons from the Amoco Cadiz oil spill observed at a variety of coastal environments. In "Amoco Cadiz, conséquences d'une pollution accidentelle par les hydrocarbures." 159-174, CNEXO, Paris.
- FUSEY P., LAMPIN M.F., OUDOT J., 1975. Recherches sur l'élimination des hydrocarbures par voie biologique. Mater. & Org. 10: 109-147.
- OUDOT J. 1975. Contribution à l'étude de la biodégradation bactérienne des hydrocarbures, produits et facteurs susceptibles de modifier la cinétique du phénomène. Thèse Doct. Ing. Faculté des Sciences de la Vie et de l'Environnement. Dijon.
- OUDOT J., FUSEY P., VAN PRAET M., FERAL J.P., GAILL F., 1981. Hydrocarbon weathering in seashore invertebrates and sediments over a two year period following the Amoco Cadiz oil spill, influence of microbial metabolism. Environ. Pollut. (A)26: 93-110.
- WALKER J.D., COLWELL R.R., 1976. Long-chain n-alkanes occurring during microbial degradation of petroleum. Can. J. Microbiol., 22: 886-891.
- WATKINSON R.J. (Ed), 1978. Developments in biodegradation of hydrocarbons. Applied Science. London.